

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：35303
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2017
 課題番号：26461669
 研究課題名(和文) 表皮のホメオスタシス維持機構とその破綻-角化細胞分化におけるMCL1の機能解析-

研究課題名(英文) Maintenance mechanism of epidermal homeostasis and its failure- Functional analysis of MCL1 in keratinocyte differentiation-

研究代表者
 牧野 英一 (MAKINO, EIICHI)
 川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：90314674
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は2種類のMCL1コンディショナル・ノックアウト(cKO)マウスの作製に成功した。組織特異的プロモーターとして表皮基底細胞に強く発現しているケラチン5とケラチン14のプロモーターを利用してCreリコンビナーゼを誘導し、その結果としてMCL1のfloxアレルが欠損する。MCL1 cKOマウスでは対照のマウスと比較して皮膚では著明な角化亢進と表皮肥厚が認められた。MCL1の免疫染色では、正常皮膚組織においてMCL1の発現は角質層において最大であり、基底層では発現は認められなかった。この事はMCL1が表皮細胞の最終分化過程において何らかの機能を発揮している可能性を示唆しており、興味深い。

研究成果の概要(英文)：We successfully generated two kinds of MCL1 conditional knockout (cKO) mice, K5-Cre: MCL1flox / flox mouse and K14-CreERT2: MCL1flox / flox mouse. In these mice, Cre recombinase was induced using the tissue specific promoters of keratin 5 (K5) and keratin 14 (K14), which were strongly expressed in epidermal basal cells, and as a result, the flox allele of MCL1 is missing. In the MCL1 cKO mouse, marked hyperkeratosis and epidermal hyperplasia were observed in the skin as compared with the control mouse, but clear findings of apoptosis were not obtained. Immunostaining of MCL1 revealed that MCL1 expression was maximal in the stratum corneum in normal skin tissues and MCL1 expression was not observed in the basal layer. Interestingly, these results suggest that MCL1 may exert some function in the terminal differentiation process of epidermal cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：MCL1 表皮角化細胞 分化 ホメオスタシス アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

MCL1はBCL2ファミリーに属するアポトーシス抑制蛋白であり、表皮における機能は未だ明らかにされていない。表皮基底細胞のMCL1を特異的に欠失したマウスを作製し病理組織学的に検討したところ、表皮肥厚と著明な過角化を認めたと、アポトーシスに陥った細胞は認めなかった。この所見よりMCL1は表皮内において抗アポトーシス作用以外に増殖・分化制御にも関与しているものと想定した。

2. 研究の目的

本研究において、まず表皮ホメオスタシス維持機構におけるMCL1の役割を、ホメオスタシス維持における主要なシグナル伝達経路であるHippo経路との関連から解析し、次いで有棘細胞癌の病態基盤におけるMCL1の関与と役割を分子レベルで解明し、将来の新規治療の開発に結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究にて、MCL1と表皮ホメオスタシス維持機構との関連性の検討、さらに有棘細胞癌の病態基盤におけるMCL1の関与・役割の解明、という二つのテーマを設定し研究を遂行していく。

K5-Cre:MCL1^{lox/lox} マウス表皮の解析

表皮ホメオスタシス維持機構におけるMCL1の役割は現在のところよく分かっていない。K5-Cre:MCL1^{lox/lox}マウスを用いてMCL1を欠失した表皮の状態を詳細に解析し、基底細胞の増殖や有棘細胞の最終分化がどのような状態にあるのかを検討する。具体的には増殖についてはKi67、phosphohistone H3などの増殖マーカーを、分化についてはLoricrin、Filaggrin、Caspase-14、Involucrin、K1、K10などの分化マーカーを用いて免疫染色法とウェスタンブロットにてそれら分子の表皮内における発現を検討する。TUNEL染色やCleaved Caspase-3を用いてアポトーシス像が観察されるか否かについても検討を加える。MCL1を欠失した表皮に引き起こされた病理組織学的変化を分子レベルで解析するために、K5-Cre:MCL1^{lox/lox}マウスとWild-typeマウスの表皮を採取し、マイクロアレイ解析を行う。両者における複数の遺伝子発現パターンを比較することで、MCL1が表皮内でその役割を果たすために必要な遺伝子群の同定につながることを期待される。

免疫染色法を用いた解析

代表者牧野はMCL1が表皮内の分化した層において強く発現していることを予備実験にて確認している。本研究ではさらに共焦点顕微鏡を用い、表皮内MCL1の発現パターンを定量化し、基底層から有棘層、顆粒層、角質層へと分化していく際にMCL1の発現がいかに変化していくかを高い精度で検討していく。さらに、Hippo経路の活性化を

制御する転写因子YAPも同様にその発現パターンを検討する。

Ca²⁺にて分化誘導した培養表皮細胞ではYAP/MCL1の細胞内局在にどのような変化がみられるかを観察し、YAP/MCL1と表皮角化細胞の分化との関連につき検討する。

過去の報告で有棘細胞癌ではYAPの核内分布が増強していることが示されている。本研究ではそれら有棘細胞癌の組織切片や細胞株を用いてYAP/MCL1の免疫染色を施行し、その発現パターンを検討する

Noxa/MCL1 ダブルKOマウスの作製

代表者牧野は培養メラノサイトを用いて、MCL1による細胞死がNoxaのノックダウンによりレスキューされることを予備実験にて確認している。このデータはMCL1による細胞死にNoxaが深く関与していることを想定させる。そこでNoxa/MCL1ダブルKOマウスを作製し、表皮におけるK5-Cre:MCL1^{lox/lox}マウスの表現型がレスキューされるのか否かを詳細に観察し、採取した表皮をK5-Cre:MCL1^{lox/lox}マウスの表皮を解析した手順と同様にして解析する。

YAP/MCL1が有棘細胞癌の増殖や発生に与える影響についての解析

有棘細胞癌の細胞株を用いて、siRNA-YAPやsiRNA-MCL1処理後の細胞増殖とコロニー形成能を検討する。

皮膚2段階発癌誘発モデルとは発癌イニシエーターとしてDMBAを、発癌プロモーターとしてTPAを用いて皮膚癌を誘発する既に確立された実験法である。MCL1が有棘細胞癌の発生に与える影響を検討する目的にて、まずはK5-Cre:MCL1^{lox/lox}マウスとWild-typeマウスの表皮を採取し、それぞれヌードマウスの背中へ植皮する。植皮片が生着したことを確認した後にDMBA/TPA処理を開始し腫瘍を形成させる。腫瘍形成率を定量化することで、有棘細胞癌の発生とMCL1との関連につき解析することができる。

有棘細胞癌治療の新戦略の開発

有棘細胞癌は高齢者に多い皮膚癌であり、実際の医療現場では手術療法に耐えられない高齢者の治療法の選択に難渋する機会が多い。本研究では有棘細胞癌の新規治療、とりわけ非侵襲的な局所療法の開発に結びつく実験を行いたいと考えている。具体的にはヌードマウス皮下に有棘細胞癌の細胞株を注入し皮下腫瘍を作成し、YAP/MCL1それぞれに対するsiRNA処理が腫瘍の増大スピードに与える影響につき検討する。また、MAPキナーゼ阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤などのMCL1阻害作用をもつ分子標的治療薬をマウスに全身、あるいは局所投与し、有棘細胞癌の腫瘍形成に対する抑制効果などを評価する。

種々の皮膚疾患における YAP/MCL1 の発現

様々な皮膚疾患の病理組織切片を用いて、YAP/MCL1 の発現を、免疫染色法を用いて検討する。患者数が多く、日常診療の場でその治療に難渋することの多い尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患と YAP/MCL1 との関連につき検討する。

4 . 研究成果

我々は、MCL1 による表皮角化細胞の分化制御のメカニズムを解明するために、K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスと K14-CreERT2:MCL1 flox/flox マウスを作製した。

K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスでは組織特異的プロモーターとして表皮基底細胞に強く発現しているケラチン 5 (K5) を利用して Cre リコンビナーゼを誘導し、その結果として MCL1 の flox アレルが欠損する。K5 は表皮基底細胞以外に食道にも発現しており、K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスでは表皮角化細胞や食道の扁平上皮細胞に置ける MCL1 欠失の影響を解析することができる。同腹子である K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスと Wild-type マウスの食道を病理組織学的に検討したところ、K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスの食道では角化が著明に亢進し、内腔は角質物質で充満していた。皮膚の病理組織像でも同様に、K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスでは著明な角化亢進が認められた。表皮は全体的に肥厚し、顆粒層の肥厚も目立っていたが、興味深いことにアポトーシスに陥った細胞は光顕上明らかではなかった。以上の所見から MCL1 の欠失により表皮角化細胞の最終分化過程と表皮ホメオスタシスの維持機構に異常を来すことが推測された。

K14-CreERT2:MCL1 flox/flox マウスでは表皮基底細胞に強く発現しているケラチン 14(K14) を利用してタモキシフェン誘導性 Cre-ERT2 組み換え酵素を用いることで、タモキシフェン外用によって自在に Cre リコンビナーゼを誘導することができ、その結果として MCL1 の flox アレルが欠損する。K14-CreERT2:MCL1 flox/flox マウスの背部皮膚にタモキシフェンを外用し表皮角化細胞における MCL1 欠失の影響を調べたところ、K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスと同様に、対照のマウスと比較して皮膚では著明な角化亢進と表皮肥厚が認められたが、明らかなアポトーシスの所見は得られなかった。

次に MCL1 の免疫染色を施行したところ、正常皮膚組織において MCL1 の発現は角質層において最大であり、増殖の活発な基底層には MCL1 の発現は認められなかった。このことは、MCL1 が表皮細胞の最終分化過程においてなんらかの機能を発揮している可能性を示唆しており、興味深い。

分子レベルで解析するために、K5-Cre:MCL1 flox/flox マウスと Wild-type マウスの表皮を採取し、マイクロアレイ解析を行った。両者における複数の遺伝子発現パターンを比較し、MCL1 が表皮内でその役割を果たすために必要な遺伝子群を

いくつか同定できた。現在、MCL1 を介した蛋白質間相互作用の解析を行っている。マイクロアレイ解析の結果と蛋白質間相互作用の解析結果とを総合して、MCL1 が如何にして表皮細胞分化の最終段階の制御に関与しているかを、さらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)
第 13 回中国研究皮膚科セミナー
「角化細胞分化における MCL1 の機能解析」
牧野英一(2017 年 10 月 21 日 於 広島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
牧野 英一(Makino Eiichi)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：90314674

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()